

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В.И. Ульянова-Ленина»**

На правах рукописи

РУДАКОВА Майя Анатольевна

**САМОДИФФУЗИЯ ВОДЫ В ОРИЕНТИРОВАННЫХ
ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ**

Специальность 01.04.07 – физика конденсированного состояния

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Казань 2007

Работа выполнена в Казанском государственном университете.

Научный руководитель:	доктор физико-математических наук, доцент Филиппов Андрей Васильевич
Официальные оппоненты:	доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Рабинович Александр Львович доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией Котов Николай Викторович
Ведущая организация:	Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань

Защита состоится «__» _____ 2007 года в «__» часов «__» минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском государственном университете им. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «__» сентября 2007 года.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор физико-математических наук,
профессор

Еремин М.В.

Актуальность проблемы. В последние десятилетия в науке сформировалась новая область, называемая «soft condensed matter», (понятие введено де Женном в его Нобелевской лекции в 1991 году), которая изучает объекты различной природы - коллоидные и полимерные системы, гели, микроэмульсии, биологические системы и пр. Несмотря на различие этих материалов, они имеют схожие физико-химические свойства, которые являются следствием большого числа внутренних степеней свободы, сравнительно слабого взаимодействия между структурными элементами, близости энтропийного и энтальпийного вкладов в свободную энергию. Эти свойства приводят к большим термическим флуктуациям в системе, разнообразию форм равновесных структур и фаз, чувствительности системы к внешним условиям, макроскопической гибкости и наличию метастабильных состояний. Исследование данного класса объектов при помощи физико-химических методов, является залогом развития фундаментальных представлений о функционировании биообъектов, создания современных химических и биотехнологий, получения новых материалов. Изучение при помощи физических методов различных биологических объектов от субклеточных структур до автономных организмов, а также модельных биологических систем привело к открытиям, позволившим усовершенствовать современные представления о фундаментальных закономерностях функционирования клеточных структур [1].

Один из важнейших клеточных элементов - биологическая мембрана, содержит десятки видов только молекул липидов, образующих ее основу, а также белки и углеводы [1, 2]. Биомембрана осуществляет жизненно важные функции клетки, в том числе обеспечение пассивного транспорта воды и малых молекул (в частности, лекарств). Механизм такого транспорта слабо изучен на молекулярном уровне, он плохо поддается математическому описанию и компьютерному моделированию, поэтому применение тонких методов экспериментального исследования в данном случае имеет исключительное значение. Результаты такого рода исследования могут иметь как фундаментальное значение для биологии, так и прикладное значение – для медицины и биотехнологии. В частности, в последнее время для доставки лекарств к клеткам используются самоагрегаты (везикулы, липосомы, кубосомы), образованные липидами [3], таким образом, понимание механизма проницаемости липидных мембран важно и для фармакологии, с целью определения возможных подходов для управления этим механизмом.

Особыми преимуществами для исследования физического состояния и динамики молекул в сложных биологических системах обладает метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), что уже было продемонстрировано на примере реальных биомембран и модельных липидных бислоев [3,4]. Вместе с тем, возможности ЯМР для исследования биомембранных систем использованы не в полной мере, в частности, трансляционная подвижность молекул воды изучена недостаточно [5,6]. Таким образом, исследование пассивной диффузии в биомембранных системах с применением метода ЯМР является актуальным.

Цель работы состояла в изучении закономерностей пассивного транспорта воды в модельных биологических мембранах - ориентированных липидных мультибислоях на основании данных о трансляционной подвижности молекул воды и липидов, полученных методами ЯМР.

Научная новизна. В работе получены следующие новые результаты:

- i. Методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля непосредственно измерены коэффициенты трансмембранной самодиффузии воды в ориентированных мультибислоях липидов.
- ii. Предложена методика оценки проницаемости ориентированных бислоев липидов на основе данных, полученных методом ЯМР с импульсным градиентом поля. Оценены относительная доля и коэффициент самодиффузии молекул воды в гидрофобной области липидного бислоя.
- iii. Установлено влияние «дефектов» ориентированных липидных бислоев на самодиффузию воды в мультибислоях липидов.
- iv. Установлено наличие зависимости коэффициентов трансмембранной самодиффузии воды и проницаемости липидных бислоев от концентрации воды, липидного состава, температуры, фазового состояния бислоя, присутствия малых и полимерных молекул.
- v. Показано, что границы латерального фазового разделения в жидкокристаллической фазе липидного бислоя, содержащего холестерин, зависят от степени гидратации.

Практическая значимость.

- i. Полученные экспериментальные результаты, при исследовании самодиффузии воды через ориентированные мультибислои, роли гидратации и состава мембран на фазовое состояние и самодиффузию ее компонент, влияния водорастворимого полимера - могут быть использованы для развития теоретических представлений о транспортных процессах в биомембранах.
- ii. Предложенный подход измерения коэффициентов трансбислойной самодиффузии воды и малых молекул через липидные бислои с помощью метода ЯМР с импульсным градиентом поля может быть использован для изучения транспортных свойств модельных биомембран различного состава, находящихся в различных фазовых состояниях.
- iii. Разработанная методика оценки проницаемости бислоев может быть использована при подборе состава систем доставки и управляемого вывода лекарств на основе липидных самоагрегатов.
- iv. Результаты работы были использованы при разработке учебного пособия для студентов специализации «Медицинская физика» физического факультета КГУ «Диффузия липидов в биологических мембранах», Филиппов А.В., Рудакова М.А., Гиматдинов Р.С., Семина И.Г., Казань 2007, 71 с.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на следующих конференциях: итоговые научные конференции КГУ в 2002-2006 годах, Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века», Казань 2004г., 16-17 марта 2004г., Юбилейная научная конференция физического факультета КГУ, Казань 2004г., 10 ноября 2004, IV Всероссийская научная конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань 2005г., 4-7 апреля 2005., 9-ой международная Пушинская школа-конференция

молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино 2005 г., 18-22 апреля 2005., III Международной конференции «Фундаментальные проблемы физики», Казань, 13 – 18 июня 2005., XI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». Яльчик, Марий-Эл, 27 июня – 2 июля 2004., XII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». Яльчик, Марий-Эл, 27 июня – 2 июля 2005., XIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». Яльчик, Марий-Эл, 25 июня – 1 июля 2006. XIV Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». Яльчик, Марий-Эл, 25 июня – 1 июля 2007., International Symposium and Summer School in Saint Petersburg. Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 2nd Meeting «NMR in Life Sciences». Saint Petersburg, Petrodvorets, 11-15 July 2005., International Symposium «Diffusion Fundamentals I», Leipzig 2005, 12-15 November 2005.

Публикация результатов исследований.

По теме диссертации опубликованы 4 статьи и 3 статьи приняты в центральную печать, 11 статей в сборниках научных работ, 14 тезисов докладов на всероссийских и зарубежных конференциях.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке задачи, планировании и проведении экспериментов. Непосредственно выполнял экспериментальные исследования, участвовал в обсуждении и оформлении полученных результатов.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы из 84 наименований. Работа содержит 140 страниц, 5 таблиц и 60 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «**Введении**» в форме аннотированного изложения глав диссертационной работы приводятся ее основные результаты, обосновывается актуальность темы, формулируется цель диссертации, обосновывается новизна, научная и практическая значимость проведенных исследований.

Первая глава. «Строение липидного бислоя. Подвижность молекул в липидных бислоях». Эта глава посвящена обзору современных теоретических представлений и результатов экспериментальных исследований трансляционной подвижности компонент модельных и биологических мембран. Представлены общие сведения о строении, свойствах и функциях биомембран, особенностях самодиффузии молекул в этих системах в зависимости от состава, фазового состояния и температуры. Особое внимание уделяется роли воды, ее состоянию и подвижности. Обоснована постановка задачи исследования. Описано применение метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля для исследования самодиффузии молекул.

Вторая глава. «Объекты и методы исследования» содержит характеристики липидов и других использованных веществ, описана технология

приготовления образцов и особенности измерения трансляционной подвижности молекул в ориентированных липидных бислоях методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) [7], даны основные характеристики аппаратуры и применяемых импульсных последовательностей ЯМР.

Исследуемые системы. В соответствии с поставленной целью, объектами исследования были ориентированные липидные мультибислои, получаемые при гидратации сухих пленок на поверхности стекла [4]. Липиды: диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), были получены из «Avanti Lipids», а сфингомиelin (СМ) и холестерин (ХОЛ) – из «Sigma».

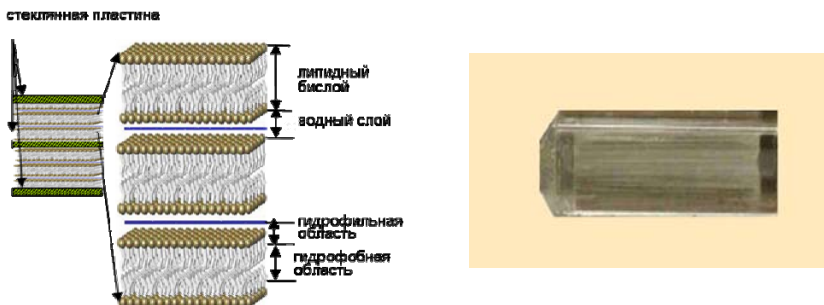


Рисунок 1. Схематическое изображение мультибислоев, ориентированных на стеклянной пластинке и вид образца, представляющий собой около 40 параллельных стеклянных пластинок с ~2000 плоских бислоев на каждой пластинке.

Экспериментальные методы. В ходе выполнения работы применялся комплекс экспериментальных методов: ЯМР ИГМП для исследования трансляционной подвижности молекул; ЯМР релаксация для соотношения вкладов в сигнале спинного эхо ЯМР ИГМП молекулярным и фазовым компонентам системы; оптическая (поляризационная и интерференционная) микроскопия для наблюдения и визуальной оценки дефектов ориентированных бислоев, ^{31}P ЯМР спектроскопия для определения фазовой структуры липидных систем.

Основные характеристики диффузометров:

Диффузометр с резонансной частотой ЯМР для протонов $f=60$ МГц, максимальная амплитуда импульсов градиента магнитного поля $g_{\text{max}} = 30$ Т/м;

Спектрометр ЯМР Varian/Chemagnetics CMX Infinity, оборудованный датчиком с ИГМП и гониометром (Cryomagnet systems, Indianapolis, IN), с резонансной частотой для протонов $f=100$ МГц, максимальная амплитуда импульсов градиента магнитного поля $g_{\text{max}} = 1,5$ Т/м.

Первичную информацию получали в виде диффузионного затухания амплитуды спинного эхо (ДЗ) выражение для которого в общем случае имеет вид:

$$A(\mathbf{q}, t_d) = \int_V d^3\mathbf{r} \int_V d^3\mathbf{r}_0 \exp\{i \cdot \mathbf{q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)\} P(\mathbf{r}, t_d | \mathbf{r}_0, 0) \rho(\mathbf{r}_0, 0), \quad (1)$$

где $\mathbf{q} = \gamma \delta \cdot \mathbf{g}$ - волновой вектор, γ - гиромагнитное отношение, δ - длительность и g - амплитуда импульса градиента, $P(\mathbf{r}, t_d | \mathbf{r}_0, 0)$ - пропагатор, который представляет собой плотность условной вероятности для спина, изначально находившегося в положении \mathbf{r}_0 , в момент времени t_d оказаться в позиции \mathbf{r} , t_d - время диффузии, $\rho(\mathbf{r}_0, 0)$ - спиновая плотность в начальный момент времени. Для получения ДЗ использовали радиочастотную импульсную последовательность «стимулированное спиновое эхо». Для самодиффузии в свободном пространстве пропагатор имеет Гауссову форму и выражение (1) принимает вид:

$$A(\mathbf{q}, t_d) = \exp(-q^2 \cdot D_0 \cdot t_d) = \exp(-\gamma^2 \cdot \delta^2 \cdot g^2 \cdot t_d \cdot D_0). \quad (2)$$

При ориентации нормали к бислоям под «магическим углом» ($\theta = 54,7^\circ$) по отношению к направлению постоянного магнитного поля, тепловое вращение молекул липидов вокруг своей оси симметрии приводит к частичному усреднению диполь-дипольных взаимодействий, при этом наблюдается сигнал эхо от липидов и воды, а ДЗ представляет собой сумму двух компонент вида (2). При отклонении значения угла θ от магического более чем на 3° , присутствует сигнал только от воды. Информация о самодиффузии воды в направлениях вдоль и поперек бислоев была получена при ориентации образцов так, что угол θ составлял 90° и 0° , соответственно.

В третьей главе «Состояние и самодиффузия воды в однокомпонентных липидных мультибислоях» обсуждаются оригинальные результаты, полученные методом ЯМР ИГМП при исследовании самодиффузии воды в ориентированных мультибислоях. Рассмотрены особенности самодиффузии воды вдоль и поперек бислоя. Проведен анализ формы диффузионных затуханий. Обсуждается связь микроструктуры ориентированных образцов с формой ДЗ. Обоснована методика получения информации о трансмембранной самодиффузии молекул воды на основании данных о самодиффузии поперек липидного бислоя, полученных методом ЯМР ИГМП.

При помощи метода ЯМР ИГМП и метода ^1H ЯМР спектроскопии было установлено, что для исследования трансмембранной самодиффузии в ориентированных липидных бислоях необходимо, чтобы степень гидратации образцов была выше некоторой равновесной степени гидратации из насыщенных паров χ_{eq} (~ 23 % вес.). При концентрациях ниже χ_{eq} , вся вода входит в гидратные оболочки полярных «голов» липидов или находится в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой, что приводит к исчезновению спинового эхо в узком интервале углов, отличных от «магического». При концентрациях же превышающих χ_{eq} сигнал спинового эхо от воды сохраняется при всех ориентациях бислоев, что свидетельствует о том, что часть воды между бислоями находится в состоянии «медленного обмена» с водой гидратных оболочек липидов.

Во всех исследованных системах самодиффузия воды обладает выраженной анизотропией (пример представлен на Рис.2), а средние значения КСД в

ориентированных бислоях существенно меньше, чем КСД свободной воды ($\sim 2,8 \cdot 10^{-9}$ м²/с при 30°C) и согласуются с литературными данными [5,6]. Самодиффузии поперек бислоев ДЗ имеет сложный вид и может быть представлено в виде распределения КСД в интервале $\sim 10^{-10}$ - 10^{-12} м²/с.

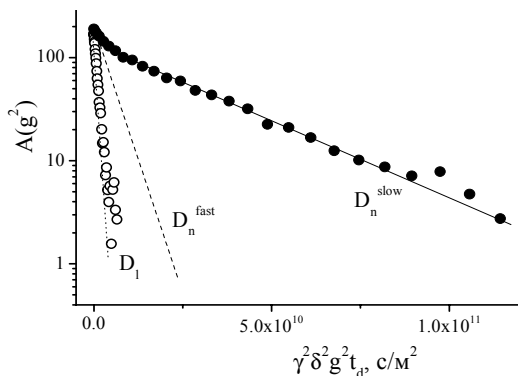


Рисунок 2. Типичный вид диффузионных затуханий для самодиффузии воды в ориентированных мультибислоях липидов при измерении самодиффузии вдоль (○) и поперек (●) бислоя. Линии показывают наклоны, соответствующие компонентам ДЗ для самодиффузии поперек бислоя. Использованный липид ДМФХ, T=30°C, время диффузии 30 мс.

Считается [5,6], что понижение КСД воды при ее самодиффузии вдоль бислоев обусловлено двумя причинами: во-первых, присутствием молекул воды, входящей в гидратную оболочку полярных голов липидных молекул, трансляционная подвижность которых близка к подвижности липидных молекул ($\sim 10^{-11}$ - 10^{-12} м²/с); во-вторых, стерическими ограничениями со стороны голов фосфолипидов (или голов доменов фосфолипидов), выступающих в водный слой [5].

Для исследуемой системы сложный вид ДЗ при измерении самодиффузии воды поперек бислоев может быть обусловлен: а) присутствием непроницаемых препятствий, которые представляют собой стеклянные пластинки подложки; б) влиянием липидных бислоев – полупроницаемых препятствий для самодиффузии молекул воды; в) наличием нескольких «фаз» воды, различающихся КСД. Для установления природы сложной формы ДЗ при самодиффузии молекул в направлении нормали к бислоям анализировали поведение ДЗ в зависимости от времени диффузии, которое варьировалось путем изменения параметров импульсной последовательности. Исследовались образцы с расстояниями между стеклянными пластинками от 7 до 60 мкм. Наиболее сильная зависимость была получена для расстояния между пластинами 7 мкм (рис.3а).

Анализ полученных зависимостей показал, что вода образует две «фазы», назовем их «быстрая» и «медленная», различающихся значениями и характером зависимости КСД от времени диффузии. Отметим, что двухкомпонентность самодиффузии поперек ориентированных мультибислоев была обнаружена и анализировалась нами впервые. Для «медленной фазы» ДЗ не зависит от времени диффузии и характеризуется коэффициентом самодиффузии $D_{\perp}^{slow} \approx 1 \cdot 10^{-12}$ м²/с для образцов с различным расстоянием между пластинками. Еще одна особенность –

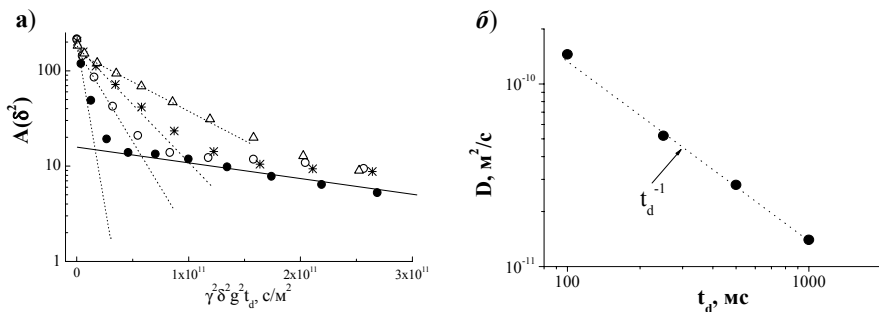


Рисунок 3. а) Вид ДЗ для самодиффузии воды поперек ориентированных мультибислоев ДМФХ при 25°C, расстояний между стеклянными пластинками 7 мкм и временах диффузии 100 мс, 500 мс, 700 мс и 1000 мс. Пунктирные линии показывают начальный наклон, сплошная линия – наклон компоненты с наименьшим КСД.; б) зависимость кажущегося КСД от t_d для компоненты ДЗ, характеризующейся наибольшим, зависящим от t_d коэффициентом самодиффузии.

отсутствие «медленной фазы» при измерении самодиффузии вдоль бислоев. Кроме того, при установлении равновесия в образце в ходе гидратации образцов наблюдается рост фракции «медленной фазы», показывающий, что она относится к более структурно совершенным (равновесным) частям системы. Указанная совокупность фактов позволяет нам полагать, что часть ДЗ, характеризующаяся D_{\perp}^{slow} связана именно с самодиффузией молекул воды через систему взаимно параллельных полупроницаемых бислоев – трансбислойной диффузией воды. Оценки показывают, что при $D_{\perp}^{\text{slow}} \sim 1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ и $t_d \sim 0,1 \text{ с}$ среднеквадратичное смещение значительно меньше чем расстояние между пластинками подложки, так что вкладом ограничений для трансбислойной диффузии от стеклянных пластин можно пренебречь.

Режим «полностью ограниченной диффузии» наблюдается для компоненты ДЗ, соответствующей «быстрой фазе» в образце с расстоянием между пластинками 7 мкм (рис. 3б), при этом расстояние между препятствиями, оцененное из соотношения Эйнштейна [7], также составляет $\sim 5 \div 8 \text{ мкм}$, очевидно, что эти препятствия образуют пластинки подложки. Для образцов с большим расстоянием между пластинками режим полностью ограниченной диффузии не достигается за времена эксперимента ЯМР ИГМП. Известно, что особенностью структуры ориентированных мультибислоев является наличие в них дефектов называемых «stacks» или трещин в бислоях [6], которые не наблюдаются в других бислоевых системах – униламеллярных или мультиламеллярных липосомах. В литературе есть упоминание о такого рода дефектах, однако исчерпывающее представление о их структуре отсутствует. Полагают, что «stacks» возникают в результате механических напряжений. С присутствием «stacks» связывают различие коэффициентов латеральной диффузии липидов, измеренных методами ЯМР ИГМП и восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания [14]. Используя методы поляризационной оптической и интерференционной микроскопии нам удалось

установить наличие между стеклянными пластинами однородных областей и дефектов в виде тонких трещин, пронизывающих всю стопку мультибислоев от одной подложки до другой. Доля этих дефектов уменьшалась по мере установления равновесия системе, например, с течением времени после введения воды с торца образца. Предполагаемая схема «внутреннего» устройства ориентированных образцов представлена на Рис.4. В случае отсутствия «cracks» вся вода была бы сосредоточена между бислоями, а сами ориентированные бислои представляли бы собой подобие «сплюснутых мультислойных липосом». В действительности, благодаря особенностям геометрии ориентированных бислоев и их тепловым флуктуациям, такая структура неустойчива и самопроизвольно «разваливается» на более мелкие липосомы. При этом границы липосом образуют видимые в микроскоп «трещины». В то время, как коэффициент самодиффузии воды при самодиффузии через бислои (транsbислойная диффузия) понижен относительно объемной воды, самодиффузия в «трещинах» достаточно свободна. Именно вода в «трещинах бислоя» (в пограничных между липосомами областях) обуславливает появление компоненты ДЗ с «быстрым» коэффициентом самодиффузии при измерении самодиффузии в направлении поперек бислоев, а сами эти трещины представляют описанные в литературе «cracks».

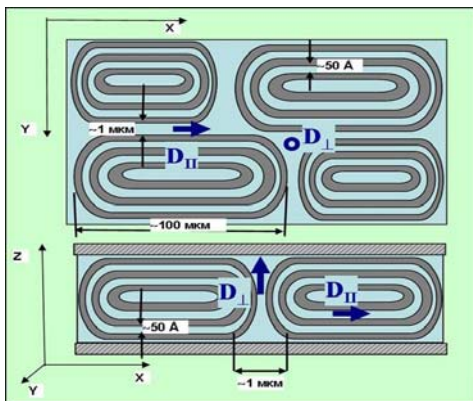


Рисунок 4. Схематическое изображение «структуры» ориентированных модельных биомембран на твердой подложке.

Приведенный выше анализ ДЗ с целью получения информации о коэффициентах самодиффузии компонент различных фаз системы представлял, по сути, «графический» метод разложения, основанный на том, что в координатах $\ln(A(g^2)/A(0))$ от $\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d$ диффузионное затухание для однокомпонентной однофазной системы имеет линейный вид [7], с наклоном равным КСД. При таком анализе велика вероятность ошибки, в частности при определении «медленной» компоненты, так как измерения при больших значениях $\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d$ производятся при малых амплитудах эхо. Для более надежного разделения ДЗ на компоненты, соответствующие транsbислойной самодиффузии и самодиффузии в дефектах «stacks» мы применили ЯМР спектроскопию с ИГМП и компьютерный «глобальный» анализ полученного набора спектров во всем интервале $\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d$. При таком анализе аппроксимация многокомпонентного экспериментального ДЗ

проводится путем подбора значений коэффициентов самодиффузии отдельных компонент по методу наименьших квадратов, принимая во внимание сохранение формы спектра для каждой компоненты. Такой анализ выполнялся с помощью программы “COmponent REsolved spectroscopy” (CORE) [8]. CORE-анализ показал, что ДЗ действительно является двухкомпонентным. Кроме коэффициентов самодиффузии для воды в «cracks» и воды, диффундирующей через бислои, были получены индивидуальные ^1H ЯМР спектры этих компонент. Каждый спектр представляет собой одну линию, уширенную по сравнению со спектром объемной воды, при этом химический сдвиг для линии воды в «cracks» совпадает, а для воды между бислоями смещен в низкочастотную область относительно положения линии для свободной воды вследствие отклонения локального магнитного поля между бислоями от H_0 .

Распространенной характеристикой транспорта воды через биомембрану является проницаемость. При оценке проницаемости в системе k ориентированных мультибислоев удобно использовать подход, предложенный Таннером [9] для самодиффузии воды через набор плоскопараллельных полупроницаемых мембран. Выражение для измеряемого коэффициента самодиффузии на больших временах (D_{\perp}) имеет вид

$$D_{\perp} = \frac{p \cdot l}{\frac{p \cdot l}{D_0} + 1} \quad (3)$$

где D_0 – КСД для среднеквадратичных смещений молекул меньших, чем расстояние между мембранами l , p – коэффициент проницаемости. Применительно к случаю мультибислоев, в качестве D_{∞} можно взять D_{\perp}^{slow} , а в качестве расстояния между мембранами l – оцененное нами расстояние между бислоями $\sim 70\text{\AA}$. В качестве D_0 можно взять КСД объемной воды, однако, учитывая, что бислои понижают коэффициент самодиффузии в водной прослойке (об этом свидетельствуют результаты самодиффузии вдоль бислоев), более правильно, по нашему мнению, использовать КСД воды, измеренный вдоль бислоев. Таким образом, используя значения для мультибислоев ДОФХ при 25°C , было определено $p \sim 5 \cdot 10^{-5}$ м/с. Полученное нами значение проницаемости согласуется с рядом литературных данных. Вместе с тем, в ряде других работ получено меньшее значение для проницаемости бислоев везикул [10,11]. Возможными причинами наблюдаемого различия могут быть различие в типе используемых фосфолипидов, структуре липидной системы и методе измерения проницаемости.

Дальнейший и более детальный анализ трансбислойной самодиффузии и проницаемости биомембран проводился при изучении влияния состава, гидратации и температуры.

Четвертая глава «Механизм самодиффузии воды через липидные бислои. Влияние гидратации, температуры и состава бислоя на трансбислойную самодиффузию молекул воды» содержит результаты исследования самодиффузии воды в ориентированных мультибислоях в зависимости от гидратации и температуры, а также отличающихся липидным составом и фазовым состоянием. Исследуется влияние малых амфифильных и полимерных молекул,

моделирующих лекарства. При анализе данных ЯМР ИГМП используются подходы, представленные в предыдущей главе.

Механизм пассивного транспорта через биологические мембраны обычно описывается с применением моделей «динамических пор» или «растворения-диффузии» [11-13]. В случае гидрофильных молекул и ионов полагается, что их диффузия через мембрану осуществляется за счет образования в липидном бислое пор молекулярных размеров, вследствие тепловой флуктуации плотности липидного бислоя и конформационных движений углеводородных «хвостов». «Времена жизни» таких пор, их геометрия и размеры оцениваются при помощи методов компьютерного моделирования. Для незаряженных молекул применяют теорию «растворения-диффузия», которая рассматривает мембрану в виде тонкой, статической гидрофобной пластины, погруженной в водное окружение. Для пересечения мембраны частица растворяется в гидрофобной области, диффундирует через нее и выходит с противоположной стороны мембраны. Коэффициент проницаемости зависит от толщины мембраны, коэффициентов диффузии молекул в фазах и их распределением между фазами. Обе теории были использованы при анализе зависимости коэффициента трансбислойной диффузии воды $D_{\perp} \equiv D_{\perp}^{\text{slow}}$ в мультибислоях ДОФХ от степени гидратации и температуры.

Проблема влияния степени гидратации на свойства липидного бислоя представляет особый интерес, так как вода, являясь необходимым условием не только функционирования, но и формирования липидного бислоя, как базового элемента биомембраны, оказывает воздействие на многие параметры липидного бислоя, в том числе на молекулярную подвижность его компонент. Нами было проведено исследование самодиффузии липидов и воды при изменении степени гидратации системы в диапазоне от 20–48 % вес. Обнаружено, что монотонное увеличение коэффициентов латеральной самодиффузии липидов и воды в направлении параллельном бислою происходит при значениях гидратации меньших, чем уровень заполнения гидратной оболочки головных групп липидов. Дальнейшее увеличение количества воды в межбислойном пространстве приводит к увеличению коэффициента самодиффузии воды, в то время как коэффициент латеральной самодиффузии липидов остается постоянным. Таким образом, одновременное измерение самодиффузии липидов и воды позволяет регистрировать стадии гидратации и набухания бислоя.

При исследовании трансбислойной самодиффузии воды через ориентированные мультибислои была обнаружена обратная зависимость между степенью гидратации и коэффициентом самодиффузии воды (Рис. 5), которая не может быть описана в представлении мультибислойной системы в виде набора тонких плоскопараллельных полупроницаемых пластин (модель Таннера) [9].

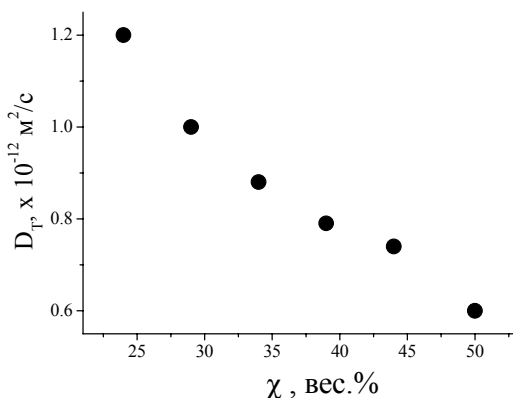


Рисунок 5. Зависимость коэффициента трансбислойной самодиффузии воды от концентрации воды в системе ориентированных бислоев ДОФХ. $T=25^\circ\text{C}$.

Также было определено, что температурная зависимость коэффициента самодиффузии воды через бислои описывается Аррениусовым законом с кажущейся энергией активации около 41 кДж/моль, что значительно превышает энергию активации для диффузии объемной воды (18 кДж/моль) (Рис. 6). Ясно, что механизмы самодиффузии воды в объеме и через липидные бислои различны.

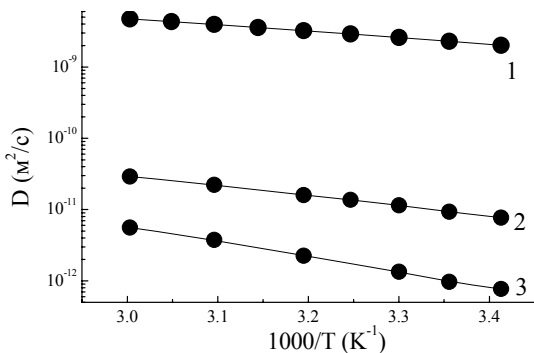


Рисунок 6. Температурные зависимости коэффициентов самодиффузии воды: в объеме (1), самодиффузии через бислои ДОФХ (3). Коэффициенты латеральной самодиффузии в бислоях ДОФХ при полной (предельной) степени гидратации (2).

Причиной наблюдаемых эффектов может являться присутствие воды в гидрофобной части бислоя. В теории «растворение-диффузия» коэффициент проницаемости через бислой рассчитывается, как $p = D_m v/b$, D_m - коэффициент диффузии воды в бислое, b - толщина бислоя, v - коэффициент распределения воды в липидном бислое. Толщина водного слоя зависит от степени гидратации как $l=l_0(\chi/1-\chi)$, где l_0 - толщина водного слоя при содержании воды 50% вес. Получим, что средний КСД воды должен подчиняться формуле:

$$D_{\perp} = A / \left(\frac{1}{\chi} - 1 \right) + B / \chi - B, \quad (4)$$

где $A = pl_0$ и $B = pb^2/l_0$. Эта зависимость хорошо описывает экспериментальные данные и позволяет найти значение проницаемости бислоя для молекул воды. Привлекая литературные данные можно сделать и другие оценки. Если взять $v = 1,3 \cdot 10^{-3}$ (как в оливковом масле), то получим, что для воды в липидной фазе коэффициент самодиффузии равен $D_m = 2,6 \cdot 10^{-10}$ м²/с. Наоборот, если D_m воды в бислое в 5 раз меньше, чем в объемной воде [15], то коэффициент распределения молекул воды между липидной и водной фазами должен быть равен $v = 7 \cdot 10^{-4}$. В обоих случаях «время жизни» молекул воды в липидной фазе очень мало, оценки дают значения около 40 - 80 нс. Существуют работы, в которых коэффициент самодиффузии воды в гидрофобной части бислоя даже выше, чем в объемной воде вследствие меньшей степени ассоциации воды. Тогда «время жизни» окажется еще меньше. Поскольку, в силу специфики метода ЯМР с ИГМП время диффузии велико (миллисекунды и более), то реализуются условия «быстрого» молекулярного обмена и на диффузионном затухании отсутствуют индивидуальные компоненты для молекул воды в гидрофобных и гидрофильных областях мультибислоев. Учитывая малое содержание воды в гидрофобной области (доли процента) можно объяснить трудность обнаружения сигнала от таких молекул методом ЯМР высокого разрешения и другими физическими методами. Тем не менее, эта «невидимая» вода вследствие относительно высокой молекулярной подвижности и приводит к неожиданному увеличению измеряемого коэффициента трансбислойной самодиффузии воды.

Полученные результаты по коэффициентам проницаемости, распределения, величине коэффициентов самодиффузии и их энергий активации хорошо согласуются с литературными данными. Поэтому можно считать, что применение модели растворение-диффузия в изучаемой системе оправданно.

В отличие от модели «растворение-диффузия», применение модели пор дает разумные оценки по содержанию воды в бислое и величине коэффициента самодиффузии воды в порах, однако совпадение известной из литературы нижней границы энергии образования поры 40 кДж/моль с экспериментально измеренной энергией активации поперечного КСД, составляющей 41 кДж/моль, при применении данной модели, предполагало бы очень малую величину энергетического барьера для перехода молекул воды сквозь образовавшуюся пору в липидном бислое, ≈ 1 кДж/моль, что значительно меньше энергии активации в чистой воде. Таким образом данная модель не вполне подходит для анализа трансбислойной диффузии воды.

Особую роль гидратация играет в многокомпонентных бислоях. При исследовании ориентированных мультибислоев фосфотидилхолин/холестерин, способных образовывать упорядоченную и неупорядоченную ЖК фазы [14], мы установили, что понижение гидратации бислоя в узком диапазоне концентраций (35 % вес. - 25 % вес.) ведет к понижению коэффициента латеральной самодиффузии липидов в области неупорядоченной ЖК фазы. В области же упорядоченной ЖК фазы такой зависимости не наблюдается. Причиной обнаруженного эффекта может оказаться то, что вода и холестерин приводят к

изменению коэффициента латеральной самодиффузии посредством разных механизмов, при определенных условиях конкурирующими между собой. Известно, что влияние холестерина на углеводородные цепи липидов в бислое заключается в их упорядочивании, которое приводит к уменьшению площади поверхности бислоя, приходящейся на молекулу фосфолипидов и далее к уменьшению коэффициента латеральной самодиффузии [4,14]. В свою очередь, вода не взаимодействует непосредственно с углеводородными цепями, а вносит изменения в полярной области бислоя [3], которые, в конечном счете, также сказываются на упорядочении бислоя и подвижности липидов. При «низких» концентрациях воды локальное движение цепей оказывается стерически более ограниченным, оказываются меньшими площадь поверхности бислоя на молекулу липида и их коэффициент латеральной самодиффузии [3,13,15]. При таких концентрациях воды ее упорядочивающее влияние оказывается определяющим даже в присутствии некоторого количества холестерина (неупорядоченная ЖК фаза). При концентрациях холестерина, достаточных для «высокой» степени упорядочения бислоя (упорядоченная ЖК фаза), его влияние на свободный объем, упорядоченность, и другие параметры бислоя превалирует и определяет значения коэффициента латеральной самодиффузии, а также вид зависимости его от концентрации холестерина во всей области концентраций воды. Таким образом, показано, что при исследовании латеральной самодиффузии липидов в бислоях с холестерином следует учитывать, что понижение концентрации воды способно привести к дополнительному упорядочиванию липидного бислоя, в случае, если эффект от холестерина выражен не в полной мере (неупорядоченная ЖК фаза). Также обнаруженный эффект позволяет предположить, что вклад холестерина в упорядочение липидного бислоя является доминирующим.

Разработанные подходы анализа трансбислойной самодиффузии были использованы для оценки проницаемости бислоев в присутствии веществ, располагающихся в гидрофобной, гидрофильной областях бислоя и области интерфейса. В качестве «модификаторов» таких характеристик липидного бислоя, как площадь поверхности на молекулу, свободный объем, упорядоченность и т.д. были выбраны стерин, малые амфифильные молекулы – модели лекарств, представленные эфирами 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты, и полиакриловая кислота (полион) (Рис. 7).

Влияния «малой» (10% мол.) и «высокой» (30% мол.) концентрации холестерина и эргостерина на ненасыщенные мультибислои на основе ДОФХ было качественно одинаково, но более выражено для эргостерина. Эффект заключался в увеличении коэффициентов латеральной самодиффузии липидов и трансбислойной самодиффузии воды в области низких концентраций, в то время как при высокой концентрации стерина коэффициенты латеральной самодиффузии липидов и трансбислойной самодиффузии воды понижались. Понижение коэффициентов самодиффузии может быть объяснено известным упорядочивающим влиянием холестерина на углеводородные цепи фосфолипидов в области больших его концентраций, в то время как рост проницаемости и латеральной подвижности в области малых концентраций стерина может быть связан с разрыхляющим эффектом, который в настоящее

время является предметом дискуссий [16]. Наши результаты показывают, что трансбислойная самодиффузия воды определяется теми же факторами, что и латеральная диффузия липидов, в частности, плотностью упаковки гидрофобной области бислоя.

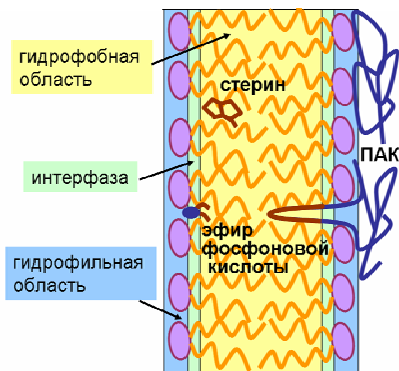


Рисунок 7. Схема модификации бислоя (физических свойств липидного бислоя) в присутствии стерина, амфифильных молекул и полиионов.

Регулярное изменение числа CH_2 групп в гидрофобной части амфифильных молекул эфиров 1,1-диметил-3-оксобутилфосфонової кислоты (диэтон, дипрон, дибуон) позволяет изменять степень гидрофобности этих молекул. В присутствии эфиров латеральная самодиффузия липидов и трансбислойная самодиффузия воды сначала возрастают, при этом наибольший эффект имеет диэтон, а при дальнейшем увеличении степени гидрофобности молекул эфиров коэффициенты латеральной самодиффузии липидов и трансбислойной самодиффузии воды понижаются. Наблюдаемый эффект вероятно связан с особенностями взаимодействия амфифильных молекул эфиров с гидрофобной и гидрофильной областями бислоя. Спектры ^{31}P ЯМР показывают, что молекулы эфиров встраиваются в бислой в область интерфазы и характеризуются анизотропией вращательной подвижности, при этом спектр суспензии фосфолипидов представляет собой пик фосфора в составе молекул фосфолипида с анизотропией химического сдвига около 50 мд, расположенный в области 20 - 25 мд с характерным плечом в низкополевой области; дополнительный пик в области - 35 мд и анизотропией около 20 мд относится к ядрам фосфора в составе эфиров. ^1H ЯМР релаксация протонов углеводородных цепей липида свидетельствует, что встраивание молекул диэтона в область интерфазы приводит к разупорядочению бислоя. При дальнейшем увеличении числа CH_2 групп в молекуле эфира в ряду от диэтилового до дибутилового происходит увеличение упорядоченности углеводородных цепей липидов, которое приводит к уменьшению коэффициентов латеральной диффузии липидов и проницаемости бислоя для молекул воды.

В отличие от низкомолекулярных веществ, молекулы водорастворимых полимеров обладают способностью изменять степень гидрофобности за счет изменения конформации макромолекулы, что может регулироваться путем изменения внешних параметров, например, для полиакриловой кислоты таким

параметром является рН водной фазы. Для ПАК была обнаружена способность изменять проницаемость мембраны при рН ниже 5,0 [17]. Мы исследовали латеральную самодиффузию липидов и самодиффузию воды через мультибислои ДОФХ и ДМФХ и установили, что при нейтральных рН присутствие ПАК приводит к уменьшению коэффициентов латеральной самодиффузии липидов и увеличению коэффициентов трансбислойной самодиффузии воды. Известно, что при взаимодействии полиионов с бислоем могут происходить латеральное фазовое разделение в жидкокристаллической фазе и образовываться латеральные домены молекул липидов, взаимодействующих с полиионом. В нашем случае, данные ДСК свидетельствуют о двухфазной структуре бислоев, а из экспоненциальности латеральной самодиффузии следует, что, домены фосфолипидов достаточно свободно «обмениваются» молекулами липидов с окружением и имеют размеры намного меньше наименьшего среднеквадратичного смещения, измеряемого методом ЯМР ИГМП при условиях эксперимента (около 1 мкм). Обычно взаимодействие липидов с амфифильными молекулами, приводящее к уменьшению коэффициентов латеральной самодиффузии липидов например, в бислоях фосфолипидов со стеринами), приводит к уменьшению проницаемости бислоя, поскольку и латеральная диффузия и проницаемость определяются величиной свободного объема молекулы липида. В случае бислоев фосфолипидов с ПАК, латеральную самодиффузию липидов и проницаемость бислоя определяют, вероятно, два различных механизма. Проницаемость для воды увеличивается вследствие присутствия «каналов», образуемых ПАК, в то время как упорядоченность углеводородных цепей липидов, вследствие взаимодействия с жесткой молекулой ПАК «заглубленной» в мембрану, возрастает, что приводит к уменьшению свободного объема и коэффициентов латеральной самодиффузии липидов. Повышение рН приводит к обратимому удалению «канала». Данные по связыванию ПАК подтверждаются ИК спектрами и термограммами ДСК.

Проведенные исследования трансбислойной диффузии воды при различных воздействиях на липидную мембрану, во-первых, позволили получить результаты, согласующиеся с литературными данными, что свидетельствует о правомерности использования ЯМР ИГМП и методик анализа диффузионных затуханий, описанных в Главе 1. Во-вторых, исследуя самодиффузию воды в липидных мультибислоях, мы получили новые данные о механизме самодиффузии молекул воды через бислои, влиянии стерина, малых амфифильных и полимерных молекул на взаимодействие этих молекул с бислоями.

ВЫВОДЫ:

1. Методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля исследована самодиффузия воды в макроскопически ориентированных мультибислоях липидов. На основе анализа данных по самодиффузии воды, полученных при различных ориентациях образцов относительно направления постоянного магнитного поля и/или градиента магнитного поля, в зависимости от времени диффузии, в сочетании данных ^1H ЯМР спектров и микроскопии впервые установлены вклады в диффузионные затухания от трансбислойной самодиффузии воды и самодиффузии воды в дефектах образцов.
2. Показано, что для непротиворечивого описания зависимостей трансбислойной самодиффузии воды в системе ориентированных мультибислоев от температуры и содержания воды необходимо предположить присутствие определенной доли молекул воды в гидрофобной части бислоя, которая находится в условиях «быстрого» молекулярного обмена с водой между липидными бислоями.
3. На основании всей совокупности данных по самодиффузии воды в макроскопически ориентированных мультибислоях липидов внесены уточнения в модель структуры ориентированных мультибислоев, определены характеристики анизотропии молекулярной подвижности воды, а также предложена методика оценки проницаемости бислоя по данным самодиффузии воды, полученным методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля
4. На примере исследования модифицированных (стеринами и амфифильными эфирами) ориентированных мультибислоев показано, что коэффициенты трансбислойной самодиффузии воды немонотонным образом зависят как от концентрации стерinov, встраивающихся в гидрофобную часть бислоя, так и от концентрации и степени гидрофобности эфиров, предпочтительно располагающихся в области интерфазы. При этом оказалось, что концентрационные зависимости коэффициента трансбислойной самодиффузии воды и коэффициента латеральной самодиффузии липидов коррелируют между собой. Это позволяет утверждать, что трансбислойная самодиффузия воды определяется теми же факторами, что и латеральная самодиффузия липидов, а именно степенью упорядоченности гидрофобной части бислоя и наличием свободного объема в бислое.
5. Обнаружено, что модификация ориентированных мультибислоев полиакриловой кислотой (полианион) приводит к существенному изменению проницаемости бислоя, причем этот эффект зависит от значения pH и проявляется в слабокислой среде. Проведенные исследования в диапазоне изменения pH от 2 до 7 показали обратимость данного эффекта, что может быть использовано для контролируемого изменения проницаемости системы.
6. Исследование латеральной самодиффузии липидов в бислоях фосфатидилхолин/холестерин показало, что упорядочение липидного бислоя в неупорядоченной жидкокристаллической фазе зависит от содержания воды в узком диапазоне концентраций (35-25% вес.), а в упорядоченной не зависит. Обнаруженный эффект позволяет предположить, что вклад холестерина в упорядочение липидного бислоя является доминирующим.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Рудакова, М.А. Исследование самодиффузии воды в модельных биологических мембранах - ориентированных липидных бислоях / М.А. Рудакова, Р.С. Гиматдинов, А.В. Филиппов // Биофизика - 2005. - Vol. 50. - P. 878-887.
2. Rudakova, M.A. Water diffusivity in model biological membranes / M. Rudakova, A. Filippov, V. Skirda // Applied Magnetic Resonance - 2004. - Vol. 27. - P. 519-526.
3. Rudakova, M.A. Water transbilayer diffusion in macroscopically oriented lipid bilayers as studied by pulsed field gradient NMR / M. Rudakova, A. Filippov // Applied Magnetic Resonance - 2005. - Vol. 29. - P. 451-457.
4. Филиппов, А.В. Латеральная диффузия насыщенных фосфатидилхолинов в бислоях с холестерином / А.В. Филиппов, М.А. Рудакова, Г. Орадд, Й. Линдблом // Биофизика - 2007. - Т.52. - С. 476-485.
8. Рудакова, М.А. Самодиффузия молекул воды в гидратированных бислоях липидов / М.А. Рудакова, А.В.Филиппов, В.Д. Скирда // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник статей, Выпуск X (Часть 2) - 2003. - Казань 2003. - P. 278-281.
9. Рудакова, М.А. Самодиффузия воды в липидных бислоях в условиях фазового перехода гель-жидкий кристалл. / М.А. Рудакова, А.А. Баталова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник статей, Выпуск XI, Ч.1 - 2004. - Казань 2004. - P. 309-314.
10. Рудакова, М.А. Самодиффузия воды в ориентированных липидных бислоях / М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник статей, Выпуск XI, Ч.1 - 2004. - Казань 2004. - P. 304-308.
11. Десятникова, И.Ю. Особенности диффузии воды в модельных биомембранах в присутствии доменов / И.Ю. Десятникова, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник статей, Выпуск XII, Ч.1 - 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - P. 258-261.
12. Трошагина, А.С. Изучение влияния дибуона на модельную биологическую мембрану методом ЯМР / А.С. Трошагина, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник статей, Выпуск XII, Ч.II - 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - P. 244-247.
13. Rudakova, M.A. Diffusivity of water in model biological membrane in the conditions of the bilayers heterogeneity: an NMR study / M.A. Rudakova, A.V. Filippov // International Symposium and Summer School in Saint Petersburg. Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 2nd Meeting "NMR in Life Sciences". Book of Abstracts. - 11-15 July 2005. - Saint Petersburg, Petrodvorets 2005. - P. 100.
14. Rudakova, M.A. Diffusivity of water in a biological model membrane: an NMR study / M.A. Rudakova, A.V. Filippov // "Diffusion Fundamentals I". Book of theses. - 2005. - Leipziger Universitatverlag 2005. - P. 586-587.
15. Рудакова, М.А. Влияние полиакриловой кислоты на диффузию воды через липидный бислой по данным ЯМР / М.А. Рудакова, В.М. Ишмухаметова, А.К.Беркович, А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. Вып. XIII, Ч. II - 2006. - Уфа 2006. - P. 166-171.

16. Дорогиницкий, М.М. Применение метода ЯМР для исследования состояния и диффузии воды в липидном бислое, проницаемости бислоя / М.М. Дорогиницкий, А.М. Хакимов, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. Вып. XIII, Ч. I - 2006. - Уфа 2006. - Р. 306-309.
17. Филиппов, А.В. Исследование методом ЯМР диффузии лекарства в биомембране / А.В. Филиппов, Г. Орадд, М.А. Рудакова, Й. Линдблом // "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. Вып. XIII, Ч. II - 2006. - Уфа 2006. - Р. 333-337.
18. Трошагина, А.С. Исследование влияния веществ, различающихся полярностью, на диффузию воды через биомембрану / А.С. Трошагина, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. Вып. XIII, Ч. II - 2006. - Уфа 2006. - Р. 305-308.
19. Рудакова, М.А. Особенности самодиффузии воды в модельных биологических мембранах / М.А. Рудакова, А.В. Филиппов, В.Д. Скирда // "Материалы и технологии XXI века", 4 научная конференция молодых ученых. Сборник тезисов. - 16-17 марта 2004. - Казань. - Р. 65.
20. Рудакова, М.А. Определение проницаемости биологических мембран методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля / М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // Юбилейная научная конференция физического факультета. Казанский государственный университет. Сборник тезисов. - 10 ноября 2004 - Казань 2004. - Р. 82.
21. Рудакова, М.А. Исследование молекулярной подвижности в ориентированных модельных мембранах в присутствии стеролов / М.А. Рудакова, О.В. Батманова, А.В. Филиппов // Сборник тезисов IV всероссийской научной конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» - 4-7 апреля 2005 - Казань 2005. - Р. 79.
22. Рудакова, М.А. Исследование проницаемости модельных ориентированных биомембран методом ЯМР с ИГМП / М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // Сборник тезисов 9-ой международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" - 18-22 апреля 2005 - Пушкино 2005. - Р. 124.
23. Рудакова, М.А. Структура и молекулярная подвижность воды в модельной биологической мембране / М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем". Сборник тезисов. Выпуск XII - 27 июня – 2 июля 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - Р. 216.
24. Филиппов, А.В. Влияние гидратации бислоев на латеральную диффузию фосфолипидов / А.В. Филиппов, М.А. Рудакова // "Структура и динамика молекулярных систем". Сборник тезисов. Выпуск XII - 27 июня – 2 июля 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - Р. 177.
25. Филиппов, А.В. Латеральная диффузия фосфолипидов в бислоях с холестерином / А.В. Филиппов, М.А. Рудакова // "Структура и динамика молекулярных систем". Сборник тезисов. Выпуск XII - 27 июня – 2 июля 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - Р. 178.
26. Десятникова, И.Ю. Особенности проницаемости двухкомпонентных и трехкомпонентных липидных мембран / И.Ю. Десятникова, М.А. Рудакова,

- А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем". Сборник тезисов. Выпуск XII. - 27 июня – 2 июля 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - Р. 66.
27. Трошагина, А.С. Исследование влияния дибуона на модельную биологическую мембрану методом ЯМР с ИГМП / А.С. Трошагина, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // "Структура и динамика молекулярных систем". Сборник тезисов. Выпуск XII - 27 июня – 2 июля 2005. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2005. - Р. 216.
28. Филиппов, А.В. Особенности структуры и трансляционного движения молекул в биологических мембранах / А.В. Филиппов, М.А. Рудакова, Г. Орадд, Й. Линдблом // "Фундаментальные проблемы физики". III Международная конференция. Сборник тезисов. - 13 – 18 июня 2005. - Казань 2005. - Р. 94.
29. Dessiatnikova, I.Y. Diffusion of water in biological membranes with lipid domains / I.Y. Dessiatnikova, M.A. Rudakova, A.V. Filippov // International Symposium and Summer School in Saint Petersburg. Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 2nd Meeting "NMR in Life Sciences". Book of Abstracts. - 15 July 2005. - Saint Petersburg, Petrodvorets 2005. - Р. 71.
30. Десятникова, И.Ю. Влияние интегральных и периферических протеинов на фазовое состояние липидного бислоя, подвижность молекул липидов и трансбислойную диффузию воды / И.Ю. Десятникова, А.М. Хакимов, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник тезисов, Выпуск XIII, Ч.II - 25 июня – 1 июля 2006. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2006. - Р. 83.
31. Дорогиницкий, М.М. Применение метода ЯМР для исследования состояния и диффузии воды в липидном бислое, проницаемости бислоя / М.М. Дорогиницкий, А.М. Хакимов, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник тезисов, Выпуск XIII, Ч.II - 25 июня – 1 июля 2006. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2006. - Р. 86.
32. Трошагина, А.С. Влияние эфиров фосфоновой кислоты на фазовое состояние липидного бислоя, его проницаемость и латеральную диффузию липидов / А.С. Трошагина, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов // «Структура и динамика молекулярных систем», Сборник тезисов, Выпуск XIII, Ч.II - 25 июня – 1 июля 2006. - Йошкар-Ола-Уфа-Казань-Москва 2006. - Р. 247.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Рубин, А.Б. Биофизика / А.Б. Рубин. – Москва, 1999. - 865 с.
2. Геннис, Р. Биомембраны / Р. Геннис - Москва: "Мир", 1997. – 690 с.
3. Ulrich, A.S. Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by ^2H -NMR / A.S. Ulrich, A. Watts // Biophysical Journal - 1994. - Vol.66. - Р. 1441 - 1449.
4. Oradd, G., NMR in macroscopically oriented lyotropic systems / G. Oradd, G. Lindblom // NMR of Orientationally Ordered Liquids - Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, - 2003, - Р. 399.

5. Wassall S.R. Pulsed field gradient-spin echo NMR studies of water diffusion in a phospholipid model membrane / S.R. Wassall // *Biophys. J.* - 1996. - Vol.71(5). - P. 2724 - 2732.
6. Wasterby P. Anisotropic water diffusion in macroscopically oriented lipid bilayers studied by pulsed magnetic field gradient / P. Wasterby, G. Oradd, G. Lindblom // *J. Magn. Res.* - 2002. - Vol.157. - P. 156 - 159.
7. Маклаков, А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров./ А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин – Казань: Изд. Казанского университета, 1987, - 258 с.
8. Stilbs, P. Global least-squares analysis of large, correlated spectral data sets: application to component-resolved FT-PGSE NMR spectroscopy / P. Stilbs, K. Paulsen, P.C. Griffiths // *Journal of Physical Chemistry* - 1996. - Vol.100. - P. 8180 - 8189.
9. Tanner J.E. Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers. Application to NMR measurements with a pulsed field gradient / J.E. Tanner // *Journal of Chemical Physics* - 1978. - Vol.69. - P. 1748-1754.
10. Jansen M. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acid chains / M. Jansen, A. Blume // *Biophysical Journal* - 1995. - Vol.68. - P. 997-1008.
11. Finkelstein, A. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes / A. Finkelstein - New York: John Wiley, 1988, - 228 p.
12. Paula S. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness / S. Paula, A.G. Volkov, A.N. Van Hoek, et al. // *Biophysical Journal* - 1996. - Vol.70. - P. 339-348.
13. Milhaud J. New insights into water-phospholipid model membrane interaction / J. Milhaud // *Biochimica et Biophysica Acta* - 2004. - Vol.1663. - P. 19-51.
14. Filippov A. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers / A. Filippov, G. Oradd, G. Lindblom // *Biophysical Journal*. - 2003. - Vol.84(5). - P. 3079 - 3086.
15. Bemporad, D. Computer Simulation of Small Molecule Permeation across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Section Area / D. Bemporad, C. Luttmann, J.W. Essex // *Biophysical Journal* - 2004. - Vol.87. - P. 1-13.
16. Trouard, T.P. Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation / T.P. Trouard, A.A. Nevzorov, T.M. Alam, et al. // *Journal of Chemical Physics*. - 1999. - Vol.110. - P. 8802 - 8818.
17. Беркович А.К. Взаимодействие полиакриловой кислоты с бислойными мембранами из фосфатидилхолина в слабокислой среде Взаимодействие полиакриловой кислоты с бислойными мембранами из фосфатидилхолина в слабокислой среде / А.К. Беркович, Н.С. Мелик-Нубаров // *Биологические Мембраны* - 2005. - Vol.22(4). - P. 370-377.

Автор выражает благодарность:

➤ Научно-образовательному центру КГУ (гранты BRHE, REC-007-3 и РНП 2.1.1.3222 «Исследование методом ЯМР структуры молекул, введенных в лиотропные среды, диффузионного механизма амфифильных молекул (лекарств) в средах, содержащих водную и лиотропную фазу (биологических мембранах)», 2006 -; 2007 г.г.).

➤ Российскому фонду фундаментальных исследований (грант 05-04-48370 «Исследование самодиффузии воды и малых молекул в модельных биологических мембранах при наличии гетерогенности липидного бислоя методом ЯМР», 2005 – 2007г.г.).

➤ НПВШ КГУ.

➤ Коллективу кафедры молекулярной физики за помощь в проведении исследования; персонально научному руководителю доц.А.В.Филиппову и заведующему кафедрой проф.В.Д.Скирде за помощь в постановке задачи исследования, плодотворные дискуссии и помощь в обсуждении результатов.